

jp03167198/pn

L3 ANSWER 1 OF 1 JAPIO COPYRIGHT 2003 JPO
ACCESSION NUMBER: 1991-167198 JAPIO
TITLE: INHIBITOR OF ANGIOTENSIN-TRANSFORMING MATERIAL
INVENTOR: KAWAMURA YUKIO; SUGIMOTO TOSHIO
PATENT ASSIGNEE(S): NATL FOOD RES INST
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	ERA	MAIN IPC
JP 03167198	A	19910719	Heisei	C07K007-06

APPLICATION INFORMATION

STN FORMAT: JP 1989-303294 19891124
ORIGINAL: JP01303294 Heisei
PRIORITY APPLN. INFO.: JP 1989-303294 19891124
SOURCE: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN (CD-ROM), Unexamined
Applications, Vol. 1991

INT. PATENT CLASSIF.:

MAIN: C07K007-06
SECONDARY: C12N009-99
ADDITIONAL: A61K037-64; A61K037-64; C12P021-06

ABSTRACT:

NEW MATERIAL: A peptide and salt of said peptide expressed by formula I or formula II.

USE: Used as a vasopressor-suppressing agent. Administration as food, etc., is possible and suppresses vasopressor in a mild action with high safety.

PREPARATION: At first, separated soybean protein separated from soybean is dissolved in water and adjusted to pH3.2 with acetic acid, then adjusted

to pH2 with hydrochloric acid. Next, pepsin is added to said solution and separated soybean protein is subjected to enzymolysis. Furthermore, resultant solution is heated to deactivate pepsin and centrifuged to divide to precipitated fraction and solution fraction. Finally, said solution fraction is fractionated with molecular sieve chromatography and purified.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A)

平3-167198

⑤Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 ⑬公開 平成3年(1991)7月19日
 C 07 K 7/06 Z 8318-4H
 C 12 N 9/99
 // A 61 K 37/64 ABU
 C 12 P 21/06 AED 8615-4C
 C 07 K 99:00 ZNA 8214-4B

審査請求 有 請求項の数 1 (全9頁)

⑭発明の名称 アンギオテンシン変換酵素阻害物質

⑰特 願 平1-303294

⑱出 願 平1(1989)11月24日

特許法第30条第1項適用 1989年5月22日、社団法人日本食品工業学会発行の「日本食品工業学会第36回大会講演集」に発表

⑲発明者 河村 幸雄 茨城県つくば市松代4丁目193番地 404棟205号

⑳発明者 杵本 敏男 茨城県つくば市吾妻1丁目1311番地の7 603棟206号

㉑出願人 農林水産省食品総合研究所長 茨城県つくば市観音台2丁目1-2

㉒代理人 弁理士 久保田 藤郎

明 細 書

1. 発明の名称

アンギオテンシン変換酵素阻害物質

2. 特許請求の範囲

1. 下記の構造式〔1〕,〔2〕に示されるペプチド及びその塩の少なくとも一種を含有することを特徴とするアンギオテンシン変換酵素阻害物質。

〔1〕 Asp-Gln-Thr-Pro-Arg-Val-Phe

〔2〕 Tyr-Arg-Ile-Leu-Glu-Phe

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は、アンギオテンシンⅠをアンギオテンシンⅡに変換させるアンギオテンシン変換酵素の活性を阻害するアンギオテンシン変換酵素阻害物質に関するものである。

〔従来技術〕

従来より、アンギオテンシン変換酵素がアンギオテンシンⅠをアンギオテンシンⅡに変換さ

せる作用を有することが知られている。

そして、このようにアンギオテンシン変換酵素によってアンギオテンシンⅠから変換されたアンギオテンシンⅡが血圧を上昇させる作用を有すると言われている。

このため、アンギオテンシンⅠをアンギオテンシンⅡに変換させるアンギオテンシン変換酵素の活性を阻害すれば、血圧の上昇を抑制することができるとして、従来より、上記のようなアンギオテンシン変換酵素の活性を阻害する物質について様々な研究が行われ、種々のアンギオテンシン変換酵素阻害物質が開発されるに至った。

そして、上記のようなアンギオテンシン変換酵素の活性を阻害する物質として、従来においては、例えば、D-2-メチル-3-メルカプトプロパノイル-L-プロリンのような合成物質の他、特開昭62-270533号公報、特開昭64-5497号公報、特開昭64-83096号公報等においてカゼインを分解させて

得られる各種のペプチドが開示されている。

しかし、上記の合成物からなるアンギオテンシン変換酵素阻害物質は、一般にアンギオテンシン変換酵素の阻害活性が高いが、合成物であるため、多くの場合、副作用等の安全性の面で若干問題を有していた。

一方、カゼイン等を分解して得られるアンギオテンシン変換酵素阻害物質の場合、上記の合成物からなるものに比べ、その阻害活性が一般に低い、その原料が天然物、特に食品由来のものであるため、一般にその毒性が低く、安全性の高いものであった。

このため、上記のように天然物、特に食品由来のアンギオテンシン変換酵素阻害物質について、さらなる開発が望まれていた。

〔発明が解決しようとする課題〕

この発明は、上記のような事情に鑑みなされたものであり、アンギオテンシンⅠをアンギオテンシンⅡに変換させるアンギンテンシン変換酵素の活性を有効に阻害して、血圧の上昇を抑

制できると共に、人体に対する安全性も高く、食品等として投与され、マイルドな作用で血圧の上昇を抑制することができるアンギオテンシン変換酵素阻害物質を提供することを課題とするものである。

〔課題を解決するための手段〕

この発明においては、アンギオテンシンⅠをアンギオテンシンⅡに変換させるアンギオテンシン変換酵素の活性を阻害するアンギオテンシン変換酵素阻害物質として、下記に示す構造式〔1〕、〔2〕のペプチド及びその塩の少なくとも一種を用いるようにしたのである。

〔1〕 Asp-Gln-Thr-Pro-Arg-Val-Phe

〔2〕 Tyr-Arg-Ile-Leu-Glu-Phe

ここで、上記ペプチドにおける塩の形態としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素塩、硫酸塩、燐酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、乳酸塩、メタンスルホン

酸塩、P-トルエンスルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられる。

また、上記ペプチドを構成するアミノ酸は、天然に存在するという点で、L-体であることが望ましい。

ここで、上記〔1〕、〔2〕の構造式に示される各ペプチドは、大豆から分離された分離大豆蛋白をペプシンによって分解させて製造することができる。

そして、上記構造式〔1〕、〔2〕に示されるペプチド及びその塩は、アンギオテンシンⅠをアンギオテンシンⅡに変換させるアンギオテンシン変換酵素の活性を阻害する作用を有すると共に、上記のように食品として使用されている大豆から得られた分離大豆蛋白を、ペプシンによって分解させて製造できる食品由来のものであり、安全性が高いものとなっている。

〔実施例〕

以下、この発明の実施例について具体的に説明する。

まず、上記〔1〕、〔2〕に示す構造式のペプチドを製造する場合について説明する。

この実施例においては、大豆から分離させた分離大豆蛋白（不二製油株式会社製 フジプロ-R）3.0gを水に溶解させ、これに酢酸を加えてpH3.2に調整し、さらに6規定の塩酸を加えてpH2.0に調整した溶液60mlとした。

そして、この溶液にペプシンを上記分離大豆蛋白の1/500の量、すなわち6mg加え、これを37℃で10時間反応させ、上記の分離大豆蛋白をペプシンによって酵素分解させた。

その後、これを100℃で15分間加熱し、上記ペプシンを失活させた後、これを遠心分離機により、10000rpmで2分間遠心分離させて、沈殿画分と溶液画分とに分離させ、沈殿画分を除去し、溶液画分だけを取り出した。

次いで、このようにして取り出された溶液画分を、分子ふるいクロマトグラフィー（ファルマシア社製 セファデックスG-25）を用いて分画するようにした。

ここで、上記の分子ふるいクロマトグラフィーによって分画を行うにあたっては、カラム容積が200mlのものを使用し、また展開液としては0.05Mの酢酸溶液を使用し、流量が4ml/hrとなるようにして、各フラクションに3mlずつ分取するようにした。

次いで、このようにして分取された各フラクションのものについて、それぞれ蛋白量及びアンギオテンシン変換酵素阻害率を測定するようにした。

ここで、蛋白量を測定するにあたり、この実施例においては、公知のTNBS法を用いて測定するようにした。

即ち、この実施例においては、0.10%のTNBS(2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸)溶液を0.5mlと、0.01Mの亜硫酸ナトリウム溶液を0.5mlと、0.15Mのホウ酸緩衝液を2.0ml加えたものに、上記の各フラクションにおけるサンプルを吸光度の測定範囲に入るように適当に希釈したものを

0.5ml加えて、これらを37℃で60分間反応させた後、分光光度計によって420nmの光の吸収を測定し、その結果を、第1図に実線で示した。なお、上記分光光度計によって測定された420nmの光の吸収が大きいほど、サンプル中におけるペプチド数が多くなっている。

また、上記のように分取された各フラクションにおけるアンギオテンシン変換酵素阻害率を測定するにあたり、この実施例においては、公知のアンギオテンシン変換酵素阻害活性測定法(Cushman-Cheung法)によってアンギオテンシン変換酵素阻害率を測定するようにした。

ここで、この実施例においては、ラビットラングアセトンパウダー(シグマ社製)10gを、100mlの50mMホウ酸緩衝液(pH8.3)に溶解させ、40000g、40分の遠心処理を行った後、その上清液を50mMのリン酸カリウム緩衝液で5倍に希釈して、アン

ギオテンシン変換酵素溶液を調製した。

一方、上記の各フラクションのものを凍結乾燥させた後、これらのものをそれぞれ50mMのリン酸カリウム緩衝液0.6mlに溶解させ、この溶液よりサンプルとしてそれぞれ50μl採取した。

そして、このように採取した50μlの各サンプルに対して、それぞれ基質Bz-Gly-His-Leu(ペプチド研究所製)と、リン酸カリウム緩衝液と塩化ナトリウムとの混合溶液と、上記のように調製したアンギオテンシン変換酵素溶液50μlとを加えて250μlにした。この時、上記溶液中における基質の最終濃度は2.5mM、リン酸カリウム緩衝液の最終濃度は100mM、塩化ナトリウムの最終濃度は300mMであった。

次いで、このように調製された各混合溶液を37℃で30分間反応させた後、1規定の塩酸を250μl添加させて反応を停止させ、その後、1.5mlの酢酸エチルを加えて10秒間攪

拌し、さらに35000rpmで2分間遠心分離させて、酢酸エチル層を1ml採取した。

そして、このように採取されたものを、エバポレートによって乾固させた後、これを1mlの蒸留水に溶解させ、抽出されたヒブリン酸の吸収(228nmの吸光度)を測定し、各フラクションにおけるサンプルのアンギオテンシン変換酵素阻害率を、下記の[1]式によって求めるようにした。

$$1 - \frac{OD_{\text{。}} - OD_{\text{。}}}{OD_{\text{。}} - OD_{\text{。}}} \times 100 \quad [1]$$

(但し、OD_。は上記のようにしてサンプルを加えて測定した時の吸光度、OD_。は上記の混合溶液を反応させる前に1規定の塩酸を250μl添加させて測定した時の吸光度、OD_。は上記の混合溶液にサンプルを加えずに測定した時の吸光度、OD_。は上記の混合溶液にサンプルを加えずに1規定の塩酸を250μl添加させて測定した時の吸光度。)

そして、このようにして測定した各フラクションのサンプルにおけるアンギオテンシン変換酵素阻害率(ACE阻害率)を第1図に破線で示した。

この結果、同図に示すように、アンギオテンシン変換酵素阻害率は、そのフラクション番号が44~60のものにおいて大きくなっていた。

このため、この実施例においては、フラクション番号が44~60の部分、すなわち分子量が約2000~200のものを分取するようにした。

そして、このようにして分取されたものを凍結乾燥させ、次いで、このように凍結乾燥されたものを、分子ふるいクロマトグラフィー(ファルマシア社製 セファデックスG-10)を使用してさらに分画するようにした。

ここで、この分子ふるいクロマトグラフィーによって分画を行うにあたっては、カラム容積が150mlになったものを使用し、また展開液

としては0.05Mの酢酸溶液を使用し、流量が3ml/hrとなるようにして、各フラクションに1mlずつ分取するようにした。

次いで、このようにして各フラクションに分取されたものについて、上記の場合と同様にし、各フラクションにおける蛋白量及びアンギオテンシン変換酵素阻害率を測定するようにした。

そして、分光光度計によって測定された各フラクションにおける420nmの光の吸収結果を第2図に実線で示す一方、各フラクションから採取された各サンプルにおけるアンギオテンシン変換酵素阻害率(ACE阻害率)を同図に破線で示した。

この結果、第2図に示すように、フラクション番号が105~130のものにおいては、ペプチド数に対するアンギオテンシン変換酵素阻害率が高くなっていた。

このため、この実施例においては、フラクション番号が105~130のもの、すなわち分

子量が約1000~400になったものを分取するようにした。

そして、このようにして分取したものを、今度は陽イオン交換分離によって、分画するようにした。

ここで、陽イオン交換分離を行うにあたっては、ファルマシア社製のFPLCユニットを使用すると共に、カラムとして陽イオン交換樹脂Mono S HR5/5(商品名)を使用し、また展開液として、0.05Mの酢酸-アンモニア緩衝液(pH7.5)を用いる一方、グラジエントとして、0.5Mの塩化ナトリウム溶液を用い、この塩化ナトリウム溶液を加える量を当初から5分間は0にし、5~25分の間で0~100%に増加させるようにし、流量が1ml/minとなるようにして、各フラクションに0.5mlずつ分取するようにした。

そして、上記のようにして分画された各フラクションのものについて、それぞれ蛋白量及びアンギオテンシン変換酵素阻害率を測定するよ

うにした。

ここで、各フラクションにおけるアンギオテンシン変換酵素阻害率を測定するにあたっては、各フラクションのものを凍結乾燥させた後、これらのものをそれぞれ50mMのリン酸カリウム緩衝液1mlに溶解させるようにし、それ以外については、上記のアンギオテンシン変換酵素阻害活性測定法と同様にし、各フラクションにおけるサンプルについてそれぞれアンギオテンシン変換酵素阻害率(ACE阻害率)を測定し、その結果を第3図(A)に示した。

一方、各フラクションにおけるサンプルについての蛋白量の測定は、公知の紫外吸光法によって行い、280nmの光の吸収を測定し、その結果を、第3図(B)に示した。なお、この場合においても、280nmの光の吸収が大きいほど、サンプル中における蛋白量が多くなっている。

この結果、上記の第3図(A)に示したように、0.5Mの塩化ナトリウム溶液を加えてい

ない時点における素通り画分においては、アンギオテンシン変換酵素阻害率が低くなっていた。

そして、この実施例のものにおいては、第3図(A)において、アンギオテンシン変換酵素阻害率が高くなったフラクション番号が28, 29のものと、フラクション番号が38, 39のものと2つのピークのことを分取するようにした。

次いで、このようにして分取したフラクション番号が28, 29のものと、フラクション番号が38, 39のものとをそれぞれ凍結乾燥させ、これらの2つのサンプルをそれぞれ40 μ lの蒸留水に溶解させた後、それぞれ高速液体クロマトグラフィー(株式会社日立製作所製のHPLC L-4200)を用いて、さらに分画を行った。

ここで、上記高速液体クロマトグラフィーによる分画においては、0.05%のテトラヒドロフルフリルアクリレート(TFA)と5%の

アセトアニリドとを加えたA溶液と、0.05%のTFAと100%のアセトアニリドとを加えたB溶液とを用い、当初から5分間は上記A溶液だけを加え、5~35分の間で、上記A溶液を100~0%に減少させる一方、B溶液を0~100%に増加させるようにして分画を行った。

そして、このように分画されたものについて、前記の紫外吸光法により、その蛋白量を測定するようにした。

この結果、フラクション番号が28, 29のものをサンプルとして用いたものにおいては、280nmの光に対して、第4図に示すような光の吸収結果が得られた。

そして、同図において光の吸収がある程度有り、適当な量の蛋白を含んでいる(a)の部分に分取し、このように分取された(a)の部分のものを凍結乾燥させた後、これを0.4 μ lの蒸留水に溶解させ、この溶液を20 μ l採取したものに、50mMのリン酸カリウム緩衝液

30 μ lを加えて50 μ lになったサンプルを調製し、前記のアンギオテンシン変換酵素阻害活性測定法と同様にして、アンギオテンシン変換酵素阻害率を測定したところ、このサンプルにおけるアンギオテンシン変換酵素阻害率は39.9%と高い値を示した。

また、フラクション番号38, 39のものをサンプルとして用いたものにおいては、280nmの光に対して、第5図に示すような光の吸収結果が得られた。

そして、同図において光の吸収が高く、蛋白量が多くなっている(b)の部分について、上記(a)の部分の場合と同様にして、アンギオテンシン変換酵素阻害率を測定したところ、この(b)の部分におけるサンプルにおいても、アンギオテンシン変換酵素阻害率が37.4%と高い値を示した。

次いで、上記の第4図に示す(a)の部分のものと、第5図に示す(b)の部分のものとをそれぞれ分取し、これらのものをそれぞれ凍結

乾燥させて、完全に溶剤を除去した後、上記の場合と同様にして、再度、上記の高速液体クロマトグラフィーによって精製を行い、その蛋白量を前記の紫外吸光法によって測定するようにした。

この結果、第4図に示す(a)の部分から精製されたものにおいては、280nmの光に対して、第6図に示すような3つの山になった光の吸収結果が得られた。

そして、同図において、第1, 第2, 第3の各山部分(a₁), (a₂), (a₃)について、それぞれ前記のようにしてアンギオテンシン変換酵素阻害率を測定したところ、(a₁)の部分はアンギオテンシン変換酵素阻害率がほぼ0%であり、(a₂)の部分はアンギオテンシン変換酵素阻害率が33.1%と高い値を示し、(a₃)の部分はアンギオテンシン変換酵素阻害率が16.1%であった。

このため、(a)の部分からは、上記のようにアンギオテンシン変換酵素阻害率が高くなっ

た(a₂)の部分に分取するようにした。

一方、第5図に示す(b)の部分から精製されたものにおいては、280nmの光に対して、第7図に示すような1つの山になった光の吸収結果が得られた。

そして、同図に山で示される部分(b₁)について、前記のようにしてアンギオテンシン変換酵素阻害率を測定したところ、アンギオテンシン変換酵素阻害率が28.4%と高い値を示したため、この山の部分に分取するようにした。

次いで、上記のようにして分取した第6図に示す(a₂)の部分のものと、第7図に示す(b₁)の部分のものについて、それぞれアミノ酸シーケンサー(アプライズバイオシステム製の477A型)により、これらに含まれるペプチドの構造を特定した。

この結果、第6図に示す(a₂)の部分のものは、下記の構造式[1]に示されるペプチドであることが、また第7図に示す(b₁)の部

分のものは、下記の構造式[2]に示されるペプチドであることが判明した。

- [1] Asp-Gln-Thr-Pro-Arg-Val-Phe
[2] Tyr-Arg-Ile-Leu-Glu-Phe

そして、このようにして得られた上記構造式[1]、[2]の各ペプチドについて、前記のアンギオテンシン変換酵素阻害活性測定法(Cushman-Chung法)によって、アンギオテンシン変換酵素阻害率が50%になるのに必要なペプチドの濃度ID₅₀を測定したところ、上記構造式[1]に示されるペプチドにおいては、そのID₅₀が42μMであり、また上記構造式[2]に示されるペプチドにおいては、そのID₅₀が156μMであった。

また、上記構造式[1]、[2]に示される各ペプチドが、その原料として使用した分離大豆蛋白に由来するものであるかを確認したところ、上記の構造式[1]に示されるアミノ酸の配列は、大豆蛋白における蛋白質画分が11s

A₃、A₄、B₃サブユニット プリカーサー配列中に存在しており、また上記の構造式[2]に示されるアミノ酸の配列は、大豆蛋白における蛋白質画分が7sα'サブユニット配列中に存在しており、上記構造式[1]、[2]に示される各ペプチドが、その原料に使用した分離大豆蛋白に由来するものであることが確認された。

従って、上記構造式[1]、[2]に示される各ペプチドは、上記のようにアンギオテンシンⅠをアンギオテンシンⅡに変換させるアンギンテンシン変換酵素に対して、その活性を有効に阻害することができ、食品等として投与することによって、血圧の上昇をマイルドな作用で抑制することが期待でき、またこれらの各ペプチドは、上記のように食品として利用されている大豆蛋白に由来するものであるため、副作用等の問題がなく、人体に対する安全性も高いものであった。

[発明の効果]

以上詳述したように、この発明に係るアンギオテンシン変換酵素阻害物質は、アンギオテンシンⅠをアンギオテンシンⅡに変換させるアンギオテンシン変換酵素の活性をマイルドな作用で有効に阻害することができると共に、食品として使用されている大豆から得られた分離大豆蛋白を、ペプシンによって分解させて製造できる食品由来のものであり、副作用等がなく、安全性が高いものとなっていた。

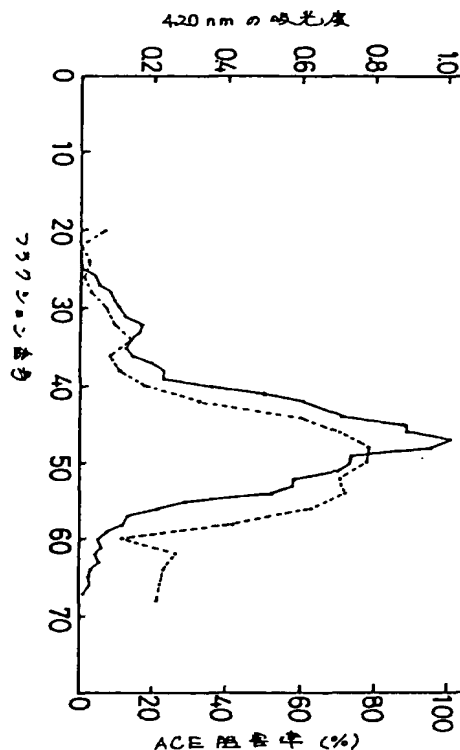
この結果、この発明に係るアンギオテンシン変換酵素阻害物質は、人体に対する安全性が高く、食品等として投与して、マイルドな作用で血圧を下げることができ、また高血圧の予防効果も期待できるものであった。

4. 図面の簡単な説明

図面はいずれもこの発明の実施例を示す図であり、第1図は分子ふるいクロマトグラフィー(ファルマシア社製 セファデックスG-25)によって分画された各フラクションにおける420nmの光に対する吸光度及びアンギオ

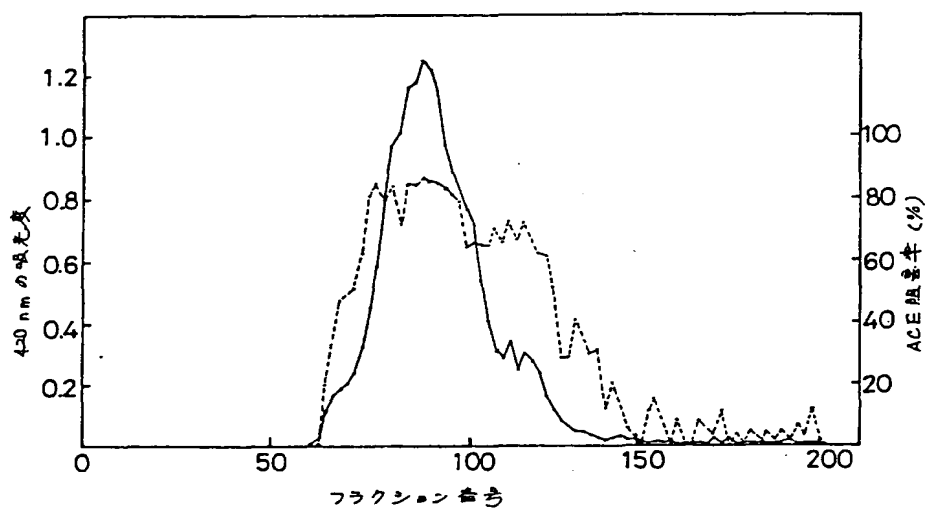
テンシン変換酵素阻害率を示す図、第2図は分子ふるいクロマトグラフィー（ファルマシア社製 セファデックスG-10）によって分画された各フラクションにおける420nmの光に対する吸光度及びアンギオテンシン変換酵素阻害率を示す図、第3図（A）、（B）は陽イオン交換分離によって分画された各フラクションにおけるアンギオテンシン変換酵素阻害率及び280nmの光に対する吸光度を示す図、第4図は高速液体クロマトグラフィーを用いて最初に分画を行った場合における280nmの光に対する吸光度を示す図、第5図は高速液体クロマトグラフィーを用いて再度分画を行った場合における280nmの光に対する吸光度を示す図である。

特許出願人 農林水産省食品総合研究所長
代理人 弁理士 久保田 藤 郎

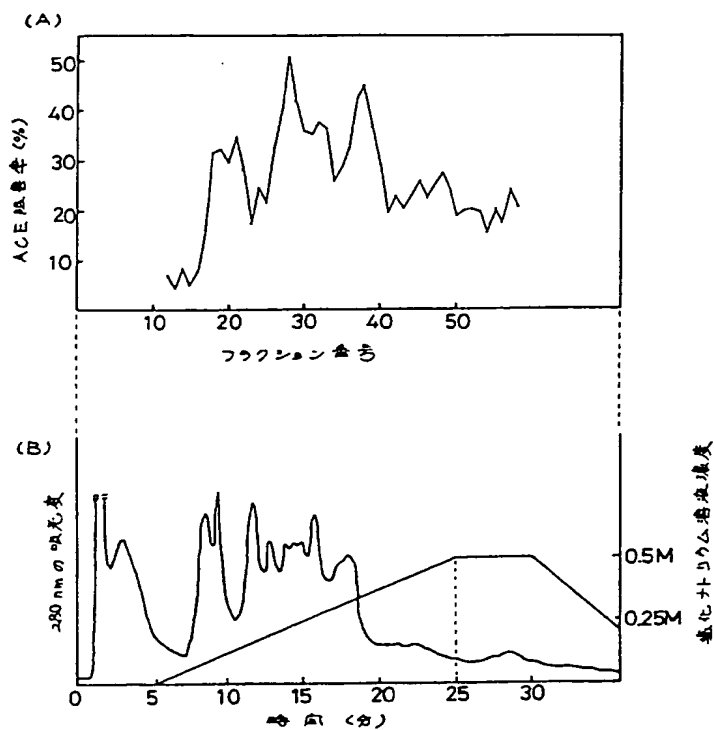


第1図

第2図

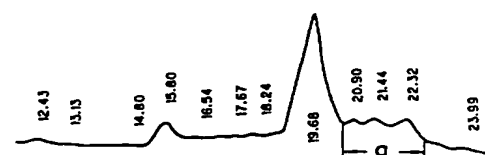


第3図

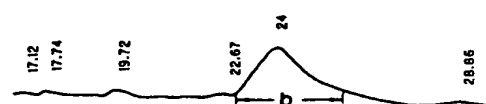


図面の浄書(内容に変更なし)

第4図

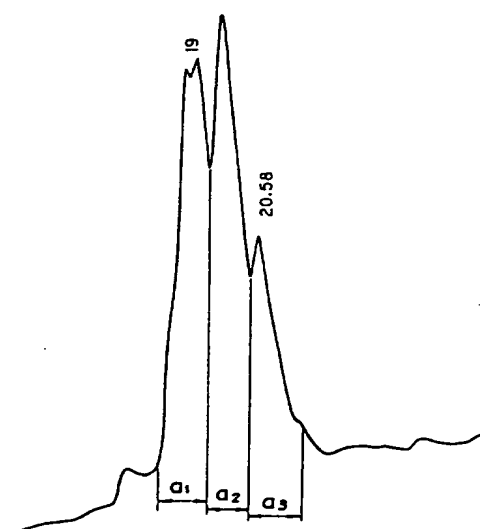


第5図

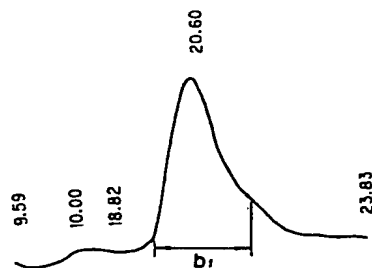


図面の浄書(内容に変更なし)

第6図



第7図



手続補正書(方式)
平成2年3月27日 差出
平成3年3月27日

特許庁長官 吉田 文毅 殿

1. 事件の表示

特願平1-303294

2. 発明の名称

アンギオテンシン変換酵素阻害物質

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

農林水産省食品総合研究所長

4. 代理人

Ⓔ104

東京都中央区京橋1丁目1番10号

西勘ビル5階

(7407) 弁理士 久保田 藤 郎

電話(275)0721番



5. 補正命令の日付

平成2年2月13日

平成2年2月27日(発送日)

6. 補正の対象

図 面

7. 補正の内容

図面(第4~7図)の浄書・別紙のとおり
(内容に変更なし)

(以上)

3.21